

Ceil specific necrosis

Publication number: ZW6094

Publication date: 1994-07-20

Inventor: BLUNDY KEITH STUART (GB); O REILLY DAVID (GB)

Applicant: CAMBRIDGE ADVANCED TECH (GB)

Classification:

- international: A01H1/00; C12N15/05; C12N15/09; C12N15/52;
C12N15/55; C12N15/62; C12N15/82; C12N15/84;
A01H1/00; C12N; C12N15/05; C12N15/09; C12N15/52;
C12N15/55; C12N15/62; C12N15/82; C12N15/84;
(IPC1-7): C12N

- European:

Application number: ZW19940000060 19940512

Priority number(s): GB19930010177 19930518

Also published as:



NZ260511 (A)

CZ285675 (B6)


Report a data error here

Abstract not available for ZW6094

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Documentos completos

 Nueva
búsqueda

 Reformular
la pregunta

 Documento
previo

Documento
siguiente 

 Lista de las
respuestas

 Página
Inicio B.D.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

Documento 14

Clasif.Principal A01H001/00

Título METODOS PARA INDUCIR EFECTOS NECROTICOS EN UNA CELULA ESPECIFICADA EN UN ORGANISMO, DISTINTO DEL REINO ANIMAL, EN RESPUESTA A UN ESTIMULO MEDIANTE LA TRANSFORMACION DEL ORGANISMO CON GENES QUIMERICOS PARA PROPORCIONAR UN DESBALANCE LE TAL DE DOS MOLECULAS, SOLAMENTE EN LA CELULA ESPECIFICA EN RESPUESTA AL ESTIMULO.

NºPublic. 199400712

NºSolicitud CLP199400712

F.Solicitud 19940517

F.Pub.Con. 19950717

Solicitante ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LIMITED

Dirección MILLBANK, KNOWLE GREEN, STAINES TW18 1DY MIDDLESEX

Nación Resid. GB

Inventores KEITH STUART BLUNDY Y DAVID O'NEILL
REILLY

Prioridades GB1993051893101772

Resumen Un método para inducir un efecto necrótico en una célula específica de un organismo, por ejemplo una planta, donde un organismo es transformado con dos genes quiméricos cuyos promotores que actúan conjuntamente como respuesta cuando dicho estímulo es aplicado a dicho organismo, tal como, como aquel constituido por un ataque patogénico, la acción necrótica sobre la célula específica del organismo de la molécula modificada por el primer gen, no es inhibida por la molécula codificada por el segundo gen, mientras en otras células la acción necrótica de la primera molécula mencionada es inhibida por la segunda molécula mencionada. Así por ejemplo, la planta transformada exhibe resistencia al ataque de nemátodos.

Cod. Publ. A

Petición de búsqueda : ((Advanced Technologies) :INVE,SOLI)

Ayuda



MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION

DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCION

Solicitud 712-94

Registro 40.134

En conformidad a la ley 19.039 sobre Propiedad Industrial, concédese a:

ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LIMITED

Domicilio : MILLBANK, KNOWLE GREEN, STAINES, MIDDLESEX TW 18 1DY
País : REINO UNIDO

Inventores
KEITH STUART BLUNDY Y DAVID O'REILLY

POR : METODOS PARA INDUCIR EFECTOS NECROTICOS EN UNA CELULA ESPECIFICADA EN UN ORGANISMO. DISTINTO DEL REINO ANIMAL. EN RESPUESTA A UN ESTIMULO MEDIANTE LA TRANSFORMACION DEL ORGANISMO CON GENES QUIMERICOS PARA PROPORCIONAR UN DESBALANCE LETAL DE DOS MOLECULAS. SOLAMENTE EN LA CELULA ESPECIFICA EN RESPUESTA AL ESTIMULO.

CIP [6] A01H 1/00 . C12N 15/82. C12N 15/29

La vigencia de este privilegio en CHILE, rige desde el 13 de Septiembre de 1999 hasta el 13 de Septiembre de 2014.

Aljondra del Rio Vega
ALEJANDRA DEL RIO VEGA
Conservador de Patentes de Inven-
y Diseños Industriales



Vladimir Garcia Huidobro Amunategui
VLADIMIR GARCIA-HUIDOBRO AMUNATEGUI
Jefe del Departamento de Propiedad
Industrial

Santiago, 20 de Diciembre de 1999

REPUBLICA DE CHILE



MINISTERIO DE ECONOMIA, FOMENTO Y RECONSTRUCCION DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

CERTIFICADO

De acuerdo a lo establecido en el artículo 48 de la ley número 19.039, de 1991, se otorga protección a contar desde el 17 de MAYO de 1994, fecha en la cual fue presentada la solicitud de patente de invención número 712-94, por:

ADVANCED TECHNOLOGIES (CAMBRIDGE) LIMITED

Con domicilio en

MILLBANK, KNOWLE GREEN, STAINES, MIDDLESEX TW 18 1DY

REINO UNIDO

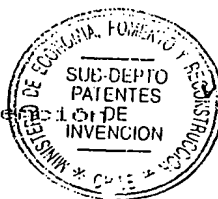
Por el invento:

MÉTODOS PARA INDUCIR EFECTOS NECRÓTICOS EN UNA CELULA ESPECIFICADA EN UN ORGANISMO, DISTINTO DEL REINO ANIMAL, EN RESPUESTA A UN ESTIMULO MEDIANTE LA TRANSFORMACION DEL ORGANISMO CON GENES QUIMERICOS PARA PROPORCIONAR UN DESBALANCE LETAL DE DOS MOLECULAS, SOLAMENTE EN LA CELULA ESPECIFICA EN RESPUESTA AL ESTIMULO.

Se deja constancia que la patente de invención número 40.134 rige desde el 13 de SEPTIEMBRE de 1999 hasta el 13 de SEPTIEMBRE de 2014.

ALEJANDRA DEL RIO VEGA

Conservador de Patentes de Invención



ADAMIR GARCIA-HUIDOBRO AMUNATEGUI
Jefe del Departamento de Propiedad Industrial

Santiago, 20 de DICIEMBRE de 1999



(19) REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:

- | | |
|---|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> INVENCIÓN | <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD |
| <input type="checkbox"/> PRECAUCIONAL | <input type="checkbox"/> MEJORA |
| <input type="checkbox"/> REVALIDA | |

(43) Fecha de Publicación: lun, jul 17, 1995

(51) Int. Cl. °:

(21) Número de Solicitud: **94-0712**

(22) Fecha de Solicitud: martes, mayo 17, 1994

(30) Número de Prioridad: (pais, n° y fecha)
Gran Bretaña 93101772 18 may, 93

(72) Nombre Inventor(es): (Incluir dirección)
Keith Stuart Blundy
David O'Reilly

(71) Nombre Solicitante: (Incluir dirección y tel.)
Advanced Technologies (Cambridge) Limited

Millbank, Knowle Green, Staines, Middlesex
TW18 1DY, Inglaterra

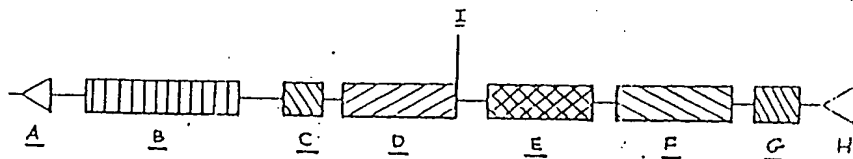
(74) Representante: (Incluir dirección y teléfono)
Patricio Claro S.A.
Marino Porzio y/o Hernán Ríos de M. y/o Cristóbal Porzio y/o
Rafael Covarrubias, domiciliados en calle Santa Lucía No.330,
Piso 7°, SANTIAGO DE CHILE (Fono 639 77 11 - Fax 632 67 32)

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

Método para inducir efectos necróticos en una célula específica en un organismo distinto del reino animal en respuesta a un estímulo mediante la transformación de organismo con genes quiméricos para proporcionar un desbalance letal de dos moléculas, solamente en la célula específica en respuesta al estímulo.

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Un método para inducir un efecto necrótico en una célula específica de un organismo, por ejemplo una planta, donde un organismo es transformado con dos genes quiméricos cuyos promotores que actúan conjuntamente como respuesta cuando dicho estímulo es aplicado a dicho organismo, tal como: cómo aquel constituido por un ataque patogénico, la acción necrótica sobre la célula específica del organismo de la molécula modificada por el primer gen, no es inhibida por la molécula codificada por el segundo gen, mientras en otras células la acción necrótica de de la primera molécula mencionada es inhibida por la segunda molécula mencionada. Así por ejemplo, la planta transformada exhibe resistencia al ataque de nemátodos.



RECEPCION DE DOCUMENTO

14 AGO 1998

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere a la inducción de necrosis específica de células como un modo de, por ejemplo, proporcionar mejor resistencia a agentes causantes de enfermedades en las plantas.

Ha sido propuesto en WO 89/10396 para transformar plantas usando una construcción que comprende un promotor específico de tejidos, y un gen que codifica RNA o un polipéptido el cual, cuando es producido en la célula para la cual el promotor es específico, perturba significativamente el metabolismo de la célula. En EP 412 911 se revela un procedimiento en el cual tal perturbación del metabolismo es combatida por la expresión de un segundo RNA o polipéptido y según es revelado en WO 92/21757, una tecnología algo similar ha sido propuesta con relación al objetivo expresado de hacer que las plantas sean resistentes a los nemátodos. EP 537 399 también proporciona una revelación de un mecanismo de alteración/inhibición.

El presente invento proporciona un método, para inducir un efecto necrótico en una célula específica de un organismo, con el cual un organismo es transformado con dos genes quiméricos; de uno de dichos genes codificando para una primera molécula necrótica para la célula, y el otro gene codifica para una segunda molécula, la cual es un inhibidor de la acción necrótica de la primera molécula; cada uno de tales genes comprende un promotor, los cuales actúan conjuntamente, en

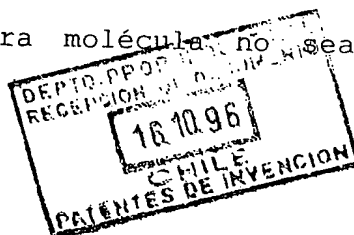


respuesta a la aplicación de un estímulo específico a dicho organismo, de modo que i) la acción necrótica, sobre la célula, de la primera molécula no sea inhibida, y ii) la expresión de la primera y segunda moléculas en otras células (las cuales son requeridas para una condición sana del organismo, no para sufrir necrosis), es tal que, es inhibida la acción necrótica de la primera molécula en otras células.

Es una ventaja del presente invento que pueda lograrse la necrosis específica de las células sin aportar un promotor específico de células. Es decir, la necrosis específica de células puede lograrse utilizando dos promotores, de los cuales ninguno es capaz de dirigir independientemente la expresión específica de la célula. Sin embargo, las características superpuestas de expresión de los dos promotores y las respuestas respectivas de los mismos a dicho estímulo, son tales que afectan la dirección de la expresión de un gen activador y un inhibidor, de modo que, se produce un desequilibrio letal de dichas dos moléculas en, y sólo en la(s) célula(s) específica(s).

El organismo puede ser una planta.

Puede ocurrir que hasta que el estímulo sea aplicado al organismo, a la célula específica por ejemplo, no existe ninguna expresión de la primera molécula en la célula específica. En tal caso, al aplicarse el estímulo, la acción conjunta de los promotores asegura que en la célula específica los niveles relativos de la primera y segunda moléculas sean tales que el efecto necrótico de la primera molécula no sea

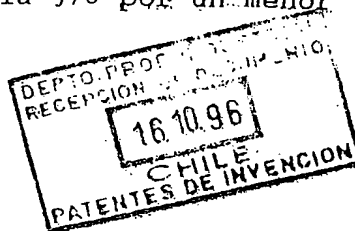


inhibido. Similarmente, puede ocurrir que antes que el estímulo sea aplicado, no exista ninguna expresión de la primera molécula en las otras células. En tal caso, la acción conjunta de los dos promotores garantiza que después de la aplicación del estímulo, los niveles relativos de la primera y segunda moléculas en las otras células sean tales que el efecto necrótico de la primera molécula sea inhibido.

Si antes de la aplicación del estímulo existe la expresión de la primera molécula en la célula específica, la acción conjunta de los dos promotores garantiza que al ocurrir la aplicación del estímulo, los niveles relativos de la primera y segunda moléculas en la célula específica cambien de modo que exista un cambio desde un estado en que la acción necrótica de la primera molécula está inhibida, a un estado en el cual ya no está inhibida.

Si antes de la aplicación del estímulo existe la expresión de la primera molécula en las otras células mencionadas, los niveles relativos de la primera y segunda moléculas en las otras células, tanto antes como después de la aplicación del estímulo, serán tales que la acción necrótica de la primera molécula sobre las otras células sea inhibida.

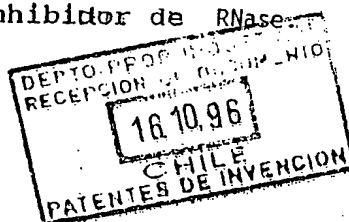
Según será aparente para una persona experta en el arte, los cambios en los niveles relativos de la primera y segunda moléculas en la célula específica al ocurrir la aplicación de dicho estímulo, puede ser efectuada por un mayor nivel de actividad del promotor del gen quimérico que contiene la codificación del gen para la primera molécula y/o por un menor



nivel de actividad del promotor del otro gen quimérico. También es posible, por supuesto, que los niveles de la primera y segunda moléculas sean ambos aumentados o disminuidos, siempre que los cambios relativos en los niveles tengan como resultado que la acción necrótica de la primera molécula ya no sea inhibida por la segunda molécula en dicha célula específica.

Los Diagramas A-F de la Figura 1 de los dibujos de este texto muestran, a modo de ejemplo, niveles de expresión (eje-y) de la primera molécula (con barrotes) y la segunda molécula (sin barrotes). El Diagrama A muestra niveles de expresión en una célula que será tratada (específica), que ha sido transformada de acuerdo con este invento, que podría existir antes de la aplicación del estímulo mencionado. El Diagrama A también podría representar los niveles relativos en células distintas a la(s) célula(s) a ser tratada(s), tanto antes como después de la aplicación del estímulo. Los Diagramas B-F representan niveles relativos diferentes de la primera molécula y la segunda molécula inhibidora en una célula(s) a ser tratada después de la aplicación de dicho estímulo. Las flechas indican aumentos o disminuciones en el nivel de expresión con relación a los niveles respectivos del Diagrama A. Se observa que en cada uno de los Diagramas B-F, la primera molécula ha sido expresada en exceso del inhibidor. En esta forma, en cada caso la necrosis tiene lugar en la(s) célula(s) a ser tratada(s).

Al hacer efectivo el presente invento, la primera molécula puede ser RNase y la segunda puede ser inhibidor de RNase.



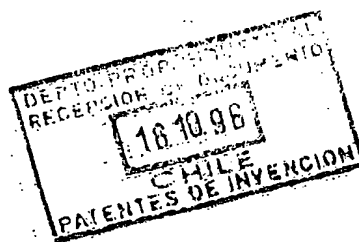
Otros ejemplos de primera y segunda moléculas son: endonucleasas de restricción (enzimas que dividen el ácido nucleico) y enzimas respectivas de modificación de ADN; proteasas (enzimas que digieren proteínas) e inhibidores respectivos de proteasa; y RNAs antisentido y con sentido para genes reguladores claves o estructurales.

El estímulo mencionado con respecto al presente invento en la forma aplicada a una planta puede estar constituido por un ataque patogénico.

Según comprenderán aquéllos expertos en el arte, el presente invento tiene una amplia aplicación a través del reino vegetal para protección contra el ataque de, por ejemplo, hongos, nemátodos, bacterias y virus, y para otros propósitos.

El presente invento puede ser utilizado como un modo de destruir o detener selectivamente el desarrollo de elementos específicos de las plantas, espinas, brotes axilares, inflorescencias o pelos punzantes, por ejemplo. En dichos casos tal estímulo sería aplicado como resultado del desarrollo natural de la planta o por la aplicación de un estímulo artificial tal como un producto químico aplicado a la planta.

Debe comprenderse que, en la forma usada aquí, el término "efecto necrótico" cubre el concepto de menoscabo substancial del metabolismo de modo que el objetivo, por ej. protección contra enfermedades, sea logrado al emplear el presente invento.

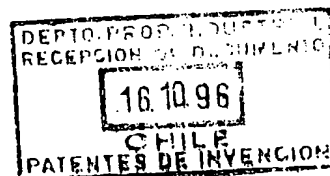


Como también realizarán aquéllos expertos en el arte, el concepto de este invento puede tener aplicación en un reino distinto al vegetal.

Un procedimiento preferido para ejecutar el presente invento, usando el ejemplo de la infección de nemátodos de nudos en la raíz de las plantas de tabaco, será descrito a continuación.

Crecimiento e Infección de Plantas de Tabaco

Semillas de tabaco C319 son germinadas con el compuesto Fisons F1 bajo las siguientes condiciones. Intensidad de luz de 4.500 a 5.000 lux, con períodos de 16 horas de luz alternando con períodos de 8 horas de oscuridad, y temperaturas entre 20°C y 25°C. Después de c. los retoños de 3 semanas son lavados suavemente en agua del caño para remover la tierra y son transferidos a bolsas (2 plantas por bolsa; Northrup-King) y se hacen crecer una semana más en un Conviron a 25°C, con una intensidad de 5.500 lux durante períodos de 16 horas alternando con períodos de oscuridad de 8 horas. Las raíces son levantadas desde la parte posterior de la bolsa y sujetas con papel de fibra de vidrio Whatan GF/A en sus puntas. Nemátodos de tres días (*M. javanica*) son entonces entregados en las puntas de estas raíces en alícuotas de 10 μ l (50 nemátodos) y un segundo papel de GF/A es colocado encima para encapsular completamente la punta de la raíz. Luego de 24 horas después de la infección, el papel GF/A es removido para asegurar una infección sincrónica. Una vez que han transcurrido 3 días después de la infección, los nudos son disecados (dejando atrás



tejido sanos de la raíz y punta de la raíz) y son congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Aproximadamente 0,5 a 1 g de tejido de raíz infectado puede ser cosechado de 80 plantas inoculadas.

Teñido para visualización de nemátodos en raíces infectadas

Para establecer la calidad de la infección, es determinado el número de nemátodos (infecciosos) por punta de raíz. Las raíces son cosechadas de plantas infectadas después de 3 días y son sumergidas durante 90 segundos en lactofenol que contiene 0,1% de Cotton Blue a 95°C. Después de un enjuague de 5 segundos en agua, las raíces son colocadas en lactofenol a temperatura de la habitación (TH) durante 3 - 4 días para aclararse. Los nemátodos teñidos luego son visualizados usando microscopía de luz.

Aislamiento de RNA de tejido de raíz sano e infectado

El tejido de la raíz es molido hasta obtener un polvo fino en un triturador o mortero enfriado (nitrógeno líquido). Alicuotas de alrededor de 100 mg son transferidas entonces a tubos Eppendorf enfriados de manera similar y se agrega 300µl de un amortiguador de extracción de fenol en caliente (50% de fenol, 50% de amortiguador de extracción : 0,1M de cloruro de litio, 0,1M Tris-HCl pH8.0 (TH), 10mM EDTA, 1% SDS) e incubados a 80°C durante 5 minutos. Se agrega un volumen equivalente de cloroformo y el producto homogenizado es microcentrifugado durante 15 minutos a 4°C. La fase acuosa es luego extraída con 600µl de fenol/cloroformo y microcentrifugada en la forma indicada anteriormente.

Después de esto, la fase acuosa es removida nuevamente y el RNA es precipitado con un volumen equivalente de cloruro de litio a 4°C de la noche a la mañana. El precipitado es convertido en pellets por microcentrifugación durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavado en 70% de etanol. El pellet es luego liofilizado, resuspendido en agua tratada con DEPC y es probado usando un espectrofotómetro. La calidad de RNA es medida por electrofóresis con gel desnaturalizante. (Adaptado de Shirzadegan et al 1991).

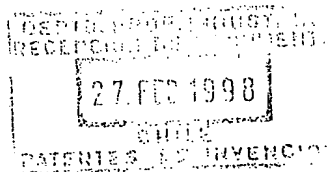
Clonación substantiva de cADNs específicos de infección

Poli(A) + RNA (mRNA) es aislado de muestras totales de RNA de 200µ de tejido de raíz C319 sano e infectado, usando esferas oligo dT magnéticas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera cadena cADN es ejecutada en el lugar en la fracción poli(A)+ unida por esferas del tejido sano. Este es el Líder ADN. La síntesis de la primera y segunda cadena es ejecutada in situ en la fracción poli(A)+ ligada por Dynabead del tejido infectado. Esta es la Meta ADN. Todas las reacciones cADN son ejecutadas usando el equipo de síntesis de cADN de Pharmacia y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tres oligonucleótidos, SUB 21 (5'CTCTTGCTTGAATTCGGACTA3'), SUB25 (5'TAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACAA3') (secuencias de Duguid y Dinauer, 1990) y LDT15 (5'GACAGAAGCGGATCCd(T)₁₅3') (O'Reilly et al, 1991) son sometidos a kinasa con la kinasa polinucleótida T4 de acuerdo con Maniatis et al, (1982). SUB21 y SUB25 luego son los templados para formar un enlazador que luego es ligado con la Meta ADN con ligasa ADN T4 de acuerdo con King & Blakesley

(1986). Después de esto, las esferas que transportan la Meta son lavados extensivamente con TE y la segunda cadena del cADN es lavada a 95°C en 5xSSC.

El RNA ligado al Impulsor ADN Líder unido a las esferas, es removido por calor y la Meta ADN removida es hibridizada con el ADN líder a 55°C en 5 x SSC durante 5 horas. La meta ADN no hibridizante es separada del ADN líder ligado a las esferas a la temperatura de la habitación siguiendo las instrucciones del fabricante, después de lo cual, la Meta ADN de hibridación es separada similarmente del Impulsor ADN ligado por botones a 95°C. La meta ADN removida a TH es entonces agregada nuevamente al líder ADN y se repite la hibridación. Este proceso es repetido hasta que la cantidad de la Meta que hibridiza a la hebra líder ya no sea superior a la cantidad que no crea híbridos. Las concentraciones de ADN son establecidas usando Dipstick de ADN de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Alicuotas de la fracción final removidos a temperatura ambiente son usadas en amplificación por PCR (Eckert et al, 1990) para generar cADN de doble hebra para su clonación en un vector plásmido. La amplificación de la Meta ADN es lograda usando los iniciadores SUB21 y LTD15 y un Creador Térmico de Ciclos Hybaid, de acuerdo con las condiciones descritas por Frohman et al, 1988. Los productos PCR son entonces ligados en el vector digerido pBluescript Smal de acuerdo con King & Blakesley (1986).



Estudio de la biblioteca substractiva por análisis de Reverse Northern.

Los recombinantes son identificados por colonia PCB (Gussow & Clackson, 1989). Las inserciones amplificadas son separadas por Southern por blot en triplicado en membranas Pall Biodyne, en la forma descrita por el fabricante de membranas. Una Hibridación previa e hibridación son efectuadas con la misma temperatura y amortiguador, los cuales son 42°C y 5 x SSPE, 0,05% BLOTTO, 50% formamida. Estos son hibridizados separadamente para sondas de cADN (ver más abajo) de tejidos sanos e infectados y a una sonda que comprenda la Meta ADN amplificada de la substracción final. Clones que muestran una señal de hibridación sólo a la sonda cADN infectada o que muestran una señal de hibridación a la sonda substraída pero no a las sondas cADN, son seleccionados para un análisis adicional.

Generación de sonda cADN

Para lograr sondas de alta actividad específica para estudios diferentes, la síntesis de cADN es efectuada 'en frío' sobre el RNA total y los productos de la síntesis son marcadas por oligomarcadores. Muestras de un total de 10µg de RNA de tejidos sanos e infectados son tratadas primero con 2,5 unidades de DNase 1 a 37°C durante 15 minutos. El DNase es luego desnaturalizado a 95°C durante 10 minutos antes de ejecutar la síntesis de cADN (protocolo estándar de Pharmacia). Luego el RNA es removido en presencia de 0,4M de hidróxido de sodio durante 10 minutos a temperatura ambiente y el ADN es purificado a través de una columna que se hace girar de Sphacryl 400HR. El rendimiento y concentración de cADN son determinados usando



Dipsticks de ADN (Invitrogen). Los productos de cADN son entonces marcados igual que para el protocolo estándar de oligomarcación de Pharmacia (c. 35ng/sonda).

Northern blot

Para determinar el perfil de expresión de los cADN seleccionados de los Northern reversos en los diferentes tejidos de la planta, los clones son usados como sondas en el análisis Northern de un total o poli (A)+ RNA de raíces, tallos, hojas y flores sanas e infectadas. Las manchas totales de RNA comprenden 25µg RNA por carril mientras que poli (A)+ manchas comprende 0,5 a 1µg RNA por carril. El RNA es sometido a electrofóresis en gel de formaldehído y es introducido en forma de manchas en la membrana Pall Biodyne B en la forma descrita por Fournery et al (1988). Las sondas son marcadas e hibridizadas en manchas en la forma descrita más arriba.

Southern blot

Para determinar si los cADN tienen origen en la planta o nemátodo, ADN C319 y M.javanica son preparados en la forma descrita por Gawel & Jarret (1991). Las manchas Southern blot son preparadas y comprenden 10µg de EcoRI y HindIII de ADN digerido por carril. Las manchas son luego hibridizadas en sondas oligoetiquetadas en la forma descrita anteriormente.

Hibridizaciones In Situ

Para determinar la localidad de expresión de los cADN de interés en el lugar de alimentación, se ejecutan hibridizaciones in situ. Tejidos de raíces infectadas y sanas.

27.07.1998

son puestos en cera, cortados e hibridizados a las sondas en la forma descrita por Jackson (1991).

Aislación de terminales 5' de mRNA

Los terminales 5' de los RNA de interés son determinados antes de la aislación de sus secuencias promotoras. Esto es logrado usando RACE 5' en la forma descrita por Frohman et al (1988).

Aislación de regiones de promotores

Las regiones de promotores de los genes de interés están aislados por un proceso llamado PCR Vértor-Ligado. Muestras de 100ng de ADN genómico C319 digerido por restricción endonucleica son ligadas durante 4 horas a temperatura ambiente (King & Blakesley, 1986) con muestras de 100ng de pBluescript (digeridas con una enzima de restricción que produce terminales compatibles). Normalmente, las enzimas usadas son EcoRI, BamHI, HindIII, BglII, XhoI, ClaI, SalI, KpnI, PstI y SstI. PCR es luego ejecutado en las ligaduras usando un iniciador de vector tal como el iniciador -40 Sequencing y un iniciador complementario al terminal 5' del mRNA. Los productos PCR son entonces convertidos en clones y colocados en secuencia. Si es necesario, el proceso es repetido con un nuevo iniciador complementario al terminal 5' del fragmento promotor para garantizar que las secuencias de control de los promotores sean aisladas.

Construcción del vector de transformación de la planta binaria, pStarnase

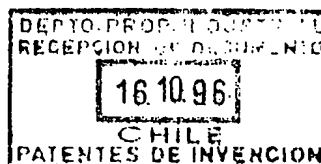
La región T-ADN del vector de transformación de la planta binaria, pStarnase, es mostrado gráficamente en la Figura 2. Esta región comprende el gen NPTII para permitir la selección de plantas transgénicas que usan kanamicina, el barstar ORF bajo el control del promotor CaMV 35S y el barnase ORF con un sitio de restricción próximo NotI para la inserción del promotor que responde al estímulo. Este vector fue depositado bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Micro-Organismos para los Fines de Procedimientos de Patentes, en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen, GB, el 5 de Mayo de 1994 bajo el número de acceso NCIMB 40634.

Clave Relativa a la Figura 2

A	-	Borde Derecho
B	-	NPTII
C	-	Terminal Nos
D	-	Barnase ORF
E	-	Promotor CaMV 35S
F	-	Barstar ORF
G	-	Terminal Nos
H	-	Borde Izquierdo
I	-	Ubicación de NotI

Producción de plantas transgénicas

Las plantas transgénicas, por ejemplo, tabaco, pueden ser producidas por el método estándar de disco de hojas con intervención de *Agrobacterium* descrito por Horsch et al (1985), para proporcionar así plantas con nudos en las raíces resistentes a nemátodos. Las semillas u otras propagulas de plantas, productos del presente invento, pueden almacenarse para uso futuro.

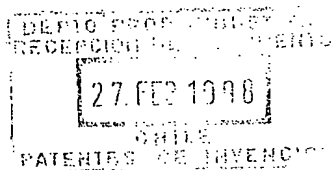


Según entenderán aquéllos expertos en el arte, con algunas clases de plantas puede ser apropiado o necesario transformar la planta por uso de un método distinto a un método con intervención de *Agrobacterium*.

EJEMPLO

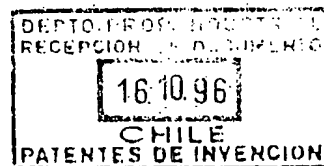
KNT1: Un ejemplo de un gen de una planta inducido por un nemátodo parasitario y el uso de su promotor de acuerdo con el invento para producir plantas resistentes a nemátodos parasitarios.

Usando los procedimientos descritos más arriba, un gen, KNT1, fue identificado y aislado de plantas de tabaco, el cual, aunque expresado a un bajo nivel en plantas sanas, en la forma determinado por Northern blot fue altamente indirecto por infección por el nemátodo de nudos en la raíz, *M. javanica*. Un fragmento del promotor KNT1 de aproximadamente 0,8 Kbp de largo, del sitio de inicio de la transcripción, fue aislado en la forma descrita anteriormente e insertado en el vector relacionador GUS, pBI101 (Jefferson et al, 1987). Esto tuvo como resultado la construcción llamada pG21.08 que fue usada para transformar plantas de tabaco. Esto reveló que bajo condiciones sanas, esta secuencia promotora dirigía la expresión del gen GUS sólo en el tejido meristemático apical y lateral. Al producirse la infección con *M. javanica*, la expresión de GUS en este tejido aparentemente no cambió. Sin embargo, podía verse ahora una fuerte expresión de GUS en el sitio de alimentación del nemátodo. La misma secuencia



promotora fue entonces insertada en el sitio NotI de pStarnase de modo que controle la expresión del barnase ORF. Esto produjo la construcción pS21.08. Se observó que las plantas transformadas con esta construcción eran resistentes a la infección por el nemátodo de nudos en la raíz.

Se observó que el gen KNT1 tiene homólogos en especies de plantas distintas al tabaco. Estas incluyen, pero no están limitadas a, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* y *Beta vulgaris*. También se ha observado que el gen KNT1 ha sido inducido por especies de nemátodos de nudos y quistes de raíz. La construcción, pS21.08, ha sido depositada bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Micro-Organismos para los Fines de Procedimientos de Patentes, en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas, Aberdeen, GB, el 5 de Mayo de 1994 bajo el número de acceso NCIMB 40635.



Referencias

- DUGUID, J.R. & DINAUER, M.C. (1990) Nucleic Acids Research 18(9): 2789-2792.
- ECKERT, K.A. & KUNKEL, T.A. (1990) Nucleic Acids Research 18(31): 3737-3744.
- FOURNEY, R.M., MIYAKOSHI, J., DAY III, R.S. & PATERSON, M.C. (1988) Focus 10(1): 5-7.
- FROHMAN, M.A., DUSH, M.K. & MARTIN, G.R. (1988) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85: 8998-9002.
- GAWEL, N.J. & JARRET, R.L. (1991). Plant Molecular Biology Reporter 9(3): 262-266.
- GUSSOW, D., & CLACKSON, T. (1989). Nucleic Acids Research 17: 4000-4008.
- HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHOLTZ, D; ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. (1985). Science 227: 1229-1231.
- JACKSON, D. (1991). Molecular Plant Pathology: A Practical Approach. IRL Press, Oxford.
- JEFFERSON, R.A.; KAVANAGH, T.A. & BEVAN, M.W. (1987) EMBO J 6 (13): 3901-3907.
- KING, P.V. & BLAKESLEY, R.W. (1986) Focus 8(1): 1-3.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. (1982) Molecular Cloning; A Laboratory Manual. N.Y. Cold Spring Harbour Laboratory.
- O'REILLY, D.; THOMAS, C.J.R. & COUTTS, R.H.A. (1991) Journal of General Virology 72: 1-7.
- SHIRZADEGAN, M.; CHRISTIE, P. & SEEMANN, J.R. (1991). Nucleic Acids Research 19(21): 6055.



REIVINDICACIONES

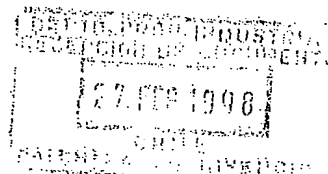
1.- Un método para producir un efecto necrótico en una célula específica de un organismo distinto del reino animal CARACTERIZADO porque un organismo es transformado con dos genes quiméricos, una secuencia codificadora de uno de dichos genes codifica para una primera molécula de célula necrótica, y una secuencia codificadora del otro gen que codifica para una segunda molécula, la cual es una inhibidora de la acción necrótica de la primera molécula; cada uno de los dos genes comprenden un promotor; dichos promotores actúan conjuntamente en respuesta a la aplicación de un estímulo específico a dicho organismo, de modo que i) la acción necrótica, sobre la célula, de la primera molécula no sea inhibida, y ii) la expresión de la primera y segunda moléculas en otras células (las cuales son requeridas para una condición sana del organismo, no para sufrir necrosis) es tal que la acción necrótica de la primera molécula sobre las otras células es inhibida.

2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque dicho organismo es una planta.

3.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque la primera molécula es una RNasa y la segunda molécula es un inhibidor de RNasa.

4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 3, CARACTERIZADO porque la primera molécula es barnasa y la segunda molécula es barstar.

5.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque la primera molécula es una endonucleasa de restricción (enzima que divide el ácido nucleico) y la



segunda molécula es la enzima correspondiente a la modificación de ADN.

- 6.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque la primera molécula es un proteasa (enzima que digiere proteínas) y la segunda molécula es el inhibidor correspondiente de dicha enzima.
- 7.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, CARACTERIZADO porque la segunda molécula es el mRNA para un gen regulador o estructural y la primera molécula es el RNA correspondiente antisentido.
- 8.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en la forma anexadas a la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho estímulo está constituido por un ataque patogénico sobre la planta.
- 9.- Un método de acuerdo con la reivindicación 8, CARACTERIZADO porque el agente patógeno es del grupo que comprende hongos, nemátodos, bacterias y virus.
- 10.- Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 anexas a la reivindicación 2, CARACTERIZADO porque dicho estímulo es el resultado del desarrollo natural de la planta o es el resultado de un estímulo artificial aplicado a la planta.

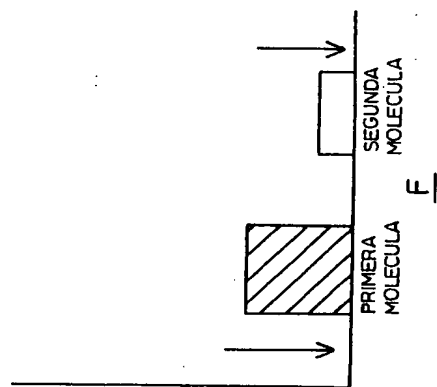
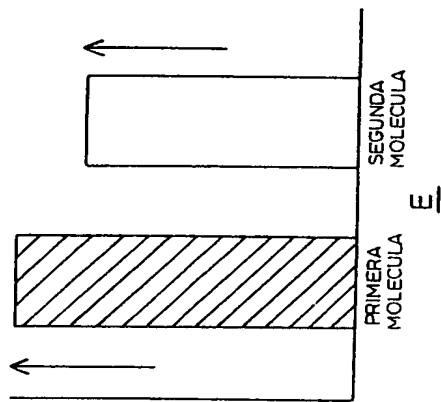
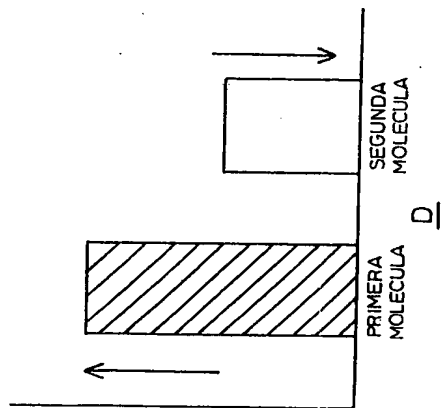
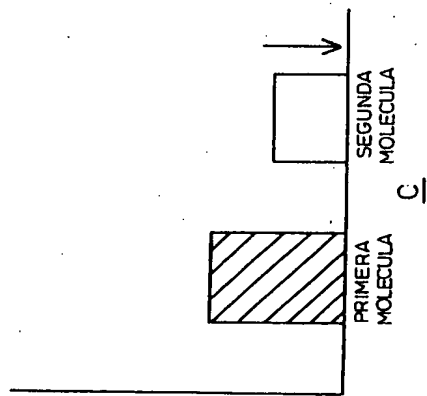
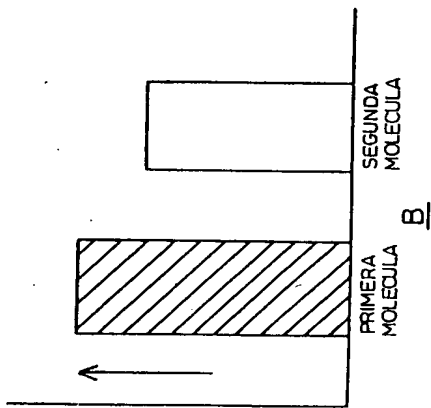
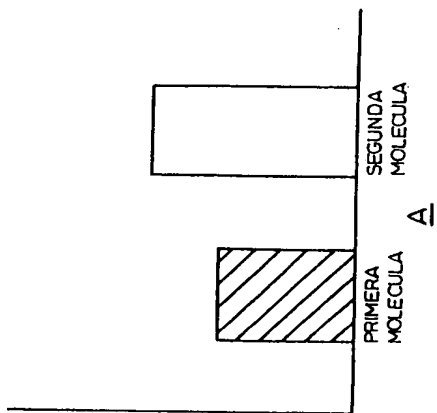


Fig. 1

23.001.1996
CHILE
PATENTES DE INVENCION